

10/535430

JC06 Rec'd PCT/PTO 19 MAY 2005

PATENT

Docket No.: 1169-035

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Maria-Elena FERREIRA et al.

: Confirmation No. *Unassigned as yet*

U.S. Patent Application No. *Unassigned as yet*

: Group Art Unit: *Unassigned as yet*

Filed: *Herewith*

: Examiner: *Unassigned as yet*

For: USE OF CANTHIN-6-ONE, PLANT EXTRACTS CONTAINING SAME AND
DERIVATIVES THEREOF IN THE TREATMENT OF TRYPANOSOMIASES

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of *France PCT/FR2003/003459 filed November 24, 2003*, and under 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of *France Patent Application No. 02 14729 filed November 25, 2002*.

Respectfully submitted,

LOWE HAUPTMAN & BERNER, LLP



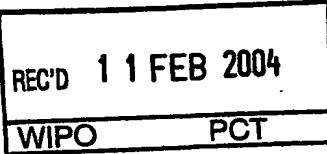
William E. Beaumont

Registration No. 30,996

1700 Diagonal Road, Suite 310
Alexandria, Virginia 22314
(703) 684-1111 WEB/sj
Facsimile: (703) 518-5499
Date: May 19, 2005



10/535430



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 NOV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354 03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 - 0 / 210502

Réervé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES DATE 25 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> VCama-F785/5FR	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet Ores 6, avenue de Messine 75008 PARIS
Confirmation d'un dépôt par télécopie 2 NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="checkbox"/> <i>N°</i> <input type="checkbox"/> <i>N°</i>	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénom Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>	
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT Etablissement Public 213, rue La Fayette 17 5 4 8 0 PARIS Cedex 10 FRANCE FRANCE N° de télécopie <i>(facultatif)</i> <input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{me} page

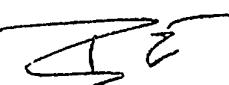
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISSÉ DES PIÈCES DATE 28 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	0214729

DB 540 17 / 210500

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
<p>Nom Prénom Cabinet ou Société</p> <p>ORÈS Béatrice CABINET ORES</p>		
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	6, avenue de Messine
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		0145627500
N° de télécopie (facultatif)		0145620486
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S)		
<p>Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</p>		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
<p>Établissement immédiat ou établissement différé</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>		
<p>Versement échelonné de la redevance (vers des personnes)</p> <p>Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
<p>Uniquement pour les personnes physiques</p> <p><input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</p>		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<p><input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences</p>		
<p>Le support électronique de données est joint</p> <p><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>		
<p>La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe</p>		
<p>Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes</p> <p>1</p>		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR-OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
<p>ORES Béatrice 92-4046</p> 		
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI		
<p>C. TRAN</p>		

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BR/SUITE

Réservé à l'INPI

 REMISE DES PIÈCES
DATE : NOV 2002

INPI PARIS

 N° DÉM. IS 11354
NATIONALISME PAR L'INPI

0214729

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CB 829 3 W / 019722

Vos références pour ce dossier (facultatif) VCama-F785/5FR		
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ <input type="checkbox"/> OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE <input type="checkbox"/> DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		
Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		
Nom ou dénomination sociale UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION		
Prénoms		
Forme juridique Etablissement Public		
N° SIREN <input type="text"/>		
Code APE-NAF <input type="text"/>		
Domicile ou siège	Rue Rio de la Plata y la gerenza	
	Code postal et ville 13 C 2 5 11 1 ASUNCION	
	Pays PARAGUAY	
Nationalité PARAGUAY		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN <input type="text"/>		
Code APE-NAF <input type="text"/>		
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR <input checked="" type="checkbox"/> DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice 92-4046		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. TRAN

L'invention a pour objet l'utilisation de la canthin-6-one, des extraits de plantes la contenant et de certains de ses dérivés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des trypanosomiases, en particulier au traitement de la maladie de Chagas.

5 En Amérique Latine, environ 90 millions de personnes vivent dans des régions où la maladie de Chagas est endémique. Environ 18 à 20 millions de personnes sont déjà infectées par l'agent responsable de cette maladie : *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

10 Les traitements chimiothérapeutiques de cette maladie reposent à ce jour sur deux familles de molécules : les nitrofuranes, comme par exemple le nifurtimox, et les nitroimidazoles, comme par exemple le benznidazole. Ces composés peuvent avoir une efficacité sur la maladie de Chagas au début de l'infection, mais ils en ont peu ou pas du tout sur cette maladie lorsque *Trypanosoma cruzi* s'est installé dans l'organisme et que la maladie a pris un caractère chronique.

15 A ce stade, cette maladie est considérée à ce jour comme incurable.

Les traitements au nifurtimox et au benznidazole sont en outre confrontés à l'apparition de souches résistantes de *Trypanosoma cruzi*, ce qui diminue encore leur efficacité dans la phase première de la maladie de Chagas. Enfin, ces deux molécules ont des effets secondaires non négligeables tels que l'anorexie, les vomissements, la 20 neuropathie périphérique et la dermopathie allergique.

Le besoin se faisait donc sentir d'un traitement de la maladie de Chagas qui soit efficace tant dans la première phase de la maladie, où *Trypanosoma cruzi* est présent essentiellement dans le sang, que dans la seconde phase de cette maladie, où l'on trouve *Tryponosoma cruzi* essentiellement dans les organes : cœur, système digestif.

25 La canthin-6-one est un composé connu qui a été isolé à partir de plantes telles que : *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) par Ohmoto *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1976, 24, 1532-1536 ; *Brucea antidyserterica* (Simaroubaceae) par Fukamiya *et al.*, Planta Med., 1987, 53, 140-143 ; *Eurycoma harmandiana* (Simaroubaceae) par Kachanapoom *et al.*, Phytochemistry, 2001, 56, 383-386 ; *Peganum nigellastrum* (Zygophyllaceae) par Ma *et al.*, Phytochemistry, 2000, 53, 1075-1078.

30 La canthin-6-one a été identifiée dans un extrait de *Zanthoxylum elephantiasis* (Rutaceae) par Mitscher *et al.*, Lloydia, 1972, 35, 177-180.

Des activités thérapeutiques de la canthin-6-one ou d'extraits végétaux la contenant ont été rapportées dans les indications suivantes :

35 le traitement de la malaria par Kordono *et al.*, J. Nat. Prod., 1991, 54(5), 1360-1367 ; comme agent antitumoral, par Fukamiya *et al.*, Planta Med., 1987, 53(2), 140-143 ; comme agent antifongique par Mitscher *et al.*, Lloydia, 1972, 35(2), 177-180.

Zanthoxylum chiloperone, d'où l'on a extrait la canthin-6-one pour la mise en œuvre de l'invention, est connu pour son utilisation en médecine traditionnelle comme antiinflammatoire, comme antipyrrhétique, contre les rhumatismes et comme antiparasitaire général.

5 Toutefois, rien dans l'art antérieur ne laissait supposer que la canthin-6-one était susceptible de constituer un traitement de la maladie de Chagas, tant dans sa phase première ou aiguë que dans sa phase chronique.

10 L'invention a donc pour objet l'utilisation de la canthin-6-one, d'extraits de plante la contenant et de certains de ses dérivés qui seront définis ci-dessous pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des trypanosomiases, en particulier le traitement de la maladie de Chagas.

La canthin-6-one a été isolée à partir de l'écorce du tronc d'une rutacée identifiée comme *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*.

15 Cette plante a été récoltée au Paraguay, près de Piribebuy dans le département de Cordillera. Un exemplaire de cette plante a été enregistré auprès de l'Herbarium de la Faculté de Chimie d'Asuncion au Paraguay sous le numéro AF917.

20 Par un procédé qui sera décrit ci-dessous ont été isolés plusieurs extraits de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. On a également isolé la canthin-6-one elle-même à partir de cette plante. Toutefois on peut également mettre en œuvre l'invention à partir de canthin-6-one isolée des autres plantes qui la contiennent et qui ont été énumérées plus haut. On peut également utiliser des extraits de *Ailanthus altissima*, de *Brucea antidysenterica*, d'*Eurycoma harmandiana*, de *Peganum nigellastrum* ou de *Zanthoxylum elephantiasis* la contenant pour mettre en œuvre l'invention.

25 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention les extraits de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* et l'isolement de la canthin-6-one ont été réalisés suivant un procédé comportant une première étape qui consiste à broyer les écorces séchées du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* puis à les traiter par une solution alcaline aqueuse, comme par exemple par une solution aqueuse d'ammoniaque.

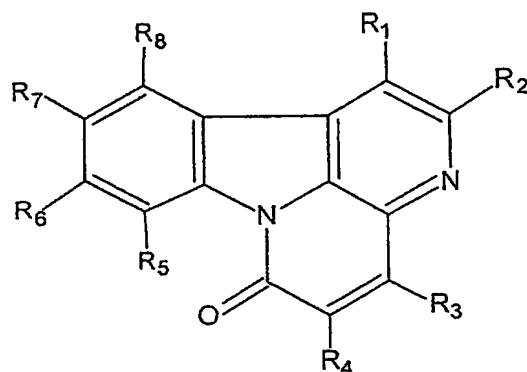
30 Le mélange obtenu est extrait par un solvant organique chloré comme par exemple du dichlorométhane.

La canthin-6-one peut ensuite être isolée et purifiée par des moyens bien connus de l'homme du métier tels que l'extraction, le lavage, la chromatographie, la précipitation, la recristallisation.

35 Le même procédé ou un procédé analogue peut être utilisé sur d'autres plantes contenant la canthin-6-one pour en obtenir des extraits comprenant la canthin-6-one ou pour isoler ce composé.

D'autres composés dérivés de la canthin-6-one peuvent être isolés des plantes citées ci-dessus par des méthodes analogues. On peut également préparer des dérivés de la canthin-6-one par des méthodes de synthèses bien connues de l'homme du métier en utilisant comme produit de départ la canthin-6-one ou tout autre composé approprié. En particulier, l'invention concerne les dérivés répondant à la formule (I) ci-dessous :

10



15

(I)

dans laquelle R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ représentent indépendamment l'un de l'autre :

- un atome d'hydrogène,
- un groupement alkyle en C₁-C₁₂ linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- un atome d'halogène choisi parmi le chlore, le fluor, le brome et l'iode,
- un groupement halogénoalkyle en C₁-C₁₂ dont la chaîne alkyle peut être linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, et le ou les atomes d'halogène sont choisis parmi le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- une fonction hydroxyle,
- une fonction nitro -NO₂,
- une fonction cyano -CN
- une fonction -SH
- une fonction acide carboxylique -COOH
- une fonction amide -CONH₂
- une fonction amine -NH₂
- une fonction alcoxy en C₁-C₁₂ dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,

- une fonction ester d'alkyle en C₁-C₁₂, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé
- une fonction alkyl amide secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C₁-C₁₂ peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylamine secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C₁-C₁₂ peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylthio en C₁-C₁₂, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé.

La canthin-6-one correspond à la formule (I) dans laquelle :

$$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = H.$$

On connaît deux formes de trypanosomiases, l'une est causée par l'agent *Trypanosoma brucei* et est plus connue sous le nom de maladie du sommeil, l'autre est causée par l'agent *Trypanosoma cruzi* et est connue comme la maladie de Chagas. L'invention s'intéresse préférentiellement à la préparation d'un traitement efficace contre *Trypanosoma cruzi*.

La canthin-6-one a montré dans les tests d'activité qui sont exposés en détail ci-dessous une efficacité étonnante contre *Trypanosoma cruzi*, en particulier à des doses dix fois plus faibles que les doses auxquelles le benznidazole est efficace.

Selon l'invention, la canthin-6-one, des extraits de plantes la contenant, ou des dérivés de la canthin-6-one, seront mis en œuvre pour traiter des individus infectés par une typanosomiase, en particulier pour traiter des individus infectés par *Trypanosoma cruzi*, à une dose comprise entre 0,01 et 100 mg/kg/j de canthin-6-one ou d'un dérivé, de préférence entre 0,1 et 50 mg/kg/j, encore plus préférentiellement entre 1 et 20 mg/kg/j.

Avantageusement, le traitement sera formulé sous forme de doses quotidiennes comprenant de 0,2 mg à 1 g de canthin-6-one ou d'un dérivé, préférentiellement de 2 à 500 mg, encore plus préférentiellement de 5 à 200 mg.

La canthin-6-one, les extraits de plantes la contenant et ses dérivés peuvent être administrés par voie orale ou parentérale, associés à tout véhicule pharmaceutique approprié. Préférentiellement, la canthin-6-one est administrée par voie orale.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants destinés à l'illustrer.

EXEMPLES :

5

Matériel et méthodes

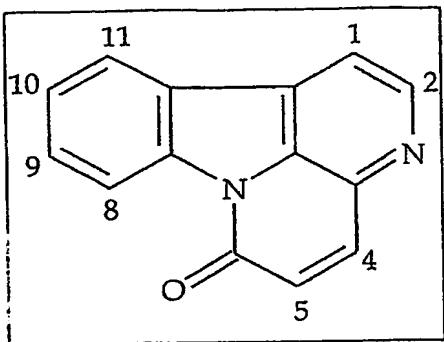
Les spectres UV ont été obtenus sur un spectromètre Philips PU 8720. Les spectres IR ont été mesurés sur un spectromètre Perkin-Elmer 257 dans des pastilles de KBr. Les spectres NMR ^1H et ^{13}C (CDCl_3) ont été obtenus sur un appareil Bruker AC-200 or AC-400 à une fréquence de respectivement 200 et 50 MHz ou de 400 et 100 MHz, respectively. Les EIMS et CIMS (méthane) ont été mesurés sur un spectromètre Nermag R10-10C. La CLHP semi-préparative a été faite à l'aide d'un détecteur Waters 590 relié à un enregistreur ABB SE 120, avec un système Millipore-Waters (Milford MA, USA) équipé d'une pompe 590, d'un injecteur SSV, et d'une colonne Prepak 1000 Millipore 15 C_{18} .

Exemple 1 : Isolement de la canthin-6-one et de la 5-méthoxy-canthin-6-one :

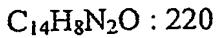
20 Le procédé d'extraction des écorces de *Zanthoxylum chiloperone* est représenté sur la figure 1 :

25 L'écorce séchée du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* (1,9 kg) est traitée au dichlorométhane dans un appareil Soxhlet pour donner, après évaporation du solvant 44g d'extrait de plante. Cet extrait est redissout puis purifié par chromatographie flash sur colonne de silice en utilisant un mélange acétate d'éthyle/dichlorométhane (8 : 2) comme éluant. On récupère 9 fractions de 250 ml chacune, numérotées 1 à 9 dans l'ordre d'élution. Les fractions f_3 à f_5 sont combinées pour donner 3,2 g de la canthin-6-one après évaporation des solvants et cristallisation dans l'acétone.

30 La fraction f_6 est purifiée par CLHP préparative en utilisant comme solvant un mélange de méthanol et d'eau (7 : 3) pour donner 150 mg de 5-méthoxy-canthin-6-one après cristallisation dans l'acétone.



Canthin-6-one



La canthin-6-one cristallise dans l'acétone sous forme d'aiguilles jaune

5 pâle.

Le point de fusion (PF), déterminé sur banc de Köfler, est de 162°C.

10 Spectre UV : MEOH _{max} nm (log ε) (dans le MeOH à 0,05g/l) : 225 (1,70), 251 (1,35), 260 (1,40), 268 (1,40), 362 (1,33), 379 (1,29) ; (+ HCl 0,5N) : 225 (Non déterminable), 266 (1,49), 273 (1,49), 304 (1,56), 360 ; (+ NaOH 1N) : 225 (Non déterminable), 251 (1,54), 259 (1,55), 267 (1,50), 362 (1,33), 379 (1,29).

Spectre IR : 1665, 1630 cm^{-1}

15 Spectre RMN ¹H : 400 MHz (CDCl_3) _ ppm : 6,90 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz, H₅) ; 7,50 (td, 1H, $J = 8,5$; 7,5 et 1 Hz, H₁₀) ; 7,70 (td, 1H, $J = 8,2$; 8,5 et 1 Hz, H₉) ; 7,90 (d, 1H, $J = 5$ Hz, H₁) ; 8,00 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz, H₄) ; 8,10 (dt, 1H, $J = 7,5$ et 1 Hz, H₁₁) ; 8,65 (dt, 1H, $J = 8,2$ et 1 Hz, H₈) ; 8,80 (d, 1H, $J = 5$ Hz, H₂).

20 Spectre RMN ¹³C : 50MHz (CDCl_3) _ ppm : 116,4 (C₁H), 117,2 (C₈H), 122,6 (C₁₁H), 124,3 (C₁₂), 125,7 (C₁₀H), 129,0 (C₅H), 130,1 (C₁₃), 130,7 (C₉H), 131,9 (C₁₄), 136,2 (C_{3a}), 139,3 (C_{7a}), 139,6 (C₄H), 145,9 (C₂H), 159,0 (C₆).

Spectre de masse : [fragment ion] m/z (%) [M+Na]⁺ 243 (100%)

25 Analyse élémentaire : C : 76,42 ; H : 3,68 ; N : 12,86 %.

Exemple 2 : Méthodologie des essais *in vivo* sur *Trypanosoma cruzi* :

Animaux et parasites : Les souris de type Pearl Bright sont élevées dans l'animalerie de l'Institut d'Investigations des Sciences Médicales (IICS, Asuncion, Paraguay) et sont âgées de 6 à 8 semaines lors des protocoles expérimentaux.

30 Pour ces essais, la souche CL (clône Brener) de *T. cruzi* est employée sous la forme circulante du parasite (trypomastigotes). Les animaux sont infectés par voie intrapéritonéale avec 5000 parasites, cette souche produit son pic de parasites 21 à 25 jours après l'infection. Chaque semaine le nombre de parasites est contrôlé par prélèvement sanguin au niveau de la queue de la souris.

Infection et traitement: Les traitements avec le benznidazole, le médicament de référence et la canthin-6-one débutent 11 jours après l'infection parasitaire à raison de 50 mg/kg ou 200 mM/kg pour le benznidazole et à la concentration de 5 mg/kg ou 20 mM/kg pour la canthin-6-one. La durée des traitements est fixée à deux semaines et la 5 voie d'administration choisie est la voie orale pour le benznidazole et la canthin-6-one, par ailleurs un groupe de souris est traité avec la canthin-6-one par voie sous cutanée. Les souris non traitées et infectées reçoivent 100 µl d'une solution saline phosphatée tamponnée.

Critères d'évaluation de l'efficacité des traitements :

- comptage hebdomadaire du nombre de parasites circulant dans le sang 10 périphérique pendant la durée de l'expérimentation, soit 10 semaines, exprimé par 10^3 parasites par ml de sang.
 - observation de la mortalité,
 - deux évaluations sérologiques, 40 jours post-infection soit 15 jours après cessation du traitement et 68 jours post-infection soit 45 jours post-traitement.
- 15 L'évaluation sérologique est effectuée à l'aide d'un test ELISA (enzyme linked immunoassay) kit Chagas, IISC, Asuncion, Paraguay. Les densités optiques sont mesurées avec un lecteur de plaques ELISA (Titerek, Unistán, I).

Etudes statistiques : La moyenne et les déviations standard de chaque groupe sont calculées, les différences entre les groupes sont déterminées par le test de 20 Student et le test non-paramétrique d'analyse de variance de Kruskal-Wallis. Les comparaisons s'effectuent entre le groupe non traité et les groupes traités, $P<0,05$.

Les résultats sont exposés dans les tableaux I et II et sur les figures 2, 3 et 4.

TABLEAU I

5 Efficacité de la canthin-6-one, du benznidazole sur des souris infectées expérimentalement avec *Trypanosoma cruzi*
 Evaluation parastitologique (Moyenne du nombre de parasites, 10^3 parasites/ml de sang \pm Déviation standard)

Jours post-infection	Témoins non traités (n = 8)	Benznidazole (n = 8)	Canthin-6-one Oral (n = 7)	Canthin-6-one Sous cutanée (n = 8)
4	0	0	0	0
11*	91 \pm 257	0	0	0
18*	314 \pm 469	35 \pm 99	286 \pm 516	766 \pm 719
25*	387 \pm 671	250 \pm 503	402 \pm 838	88 \pm 143
32	242 \pm 553	297 \pm 625	426 \pm 664	267 \pm 546
39	870 \pm 1902	118 \pm 193	37 \pm 58	2077 \pm 2214
45	836 \pm 1023	301 \pm 432	34 \pm 77 P=0,05	314 \pm 499
53	1273 \pm 1648	23 \pm 66 P=0,01	58 \pm 81 P=0,05	473 \pm 922
60	1050 \pm 2605	65 \pm 93	16 \pm 36 P<0,05	130 \pm 194
68	1144 \pm 1642	9 \pm 26 P=0,03	0 P=0,02	34 \pm 99 P=0,03

10 * Période de traitement (deux semaines)
 n = nombre de souris

15

20

25

TABLEAU II :

5 Effet du traitement avec la canthin-6-one ou du benznidazole sur des souris Pearl Bright infectées avec *T. cruzi*. Evaluation sérologique (test ELISA)

Traitements	Nb Souris	Voie adm.	1 ^a sérologie ®	Sérologie négative/ survivant	2 ^a sérologie ▽	Sérologie négative/ survivant
Témoins non traités (PBS)	8	Oral	0,3985 ± 0,092 $P < 0,001$	0 / 8 (0%)	1,598 ± 0,382	0 / 8 (0%)
Benznidazole (médicament de référence) (50 mg)	8	Oral	0,1692 ± 0,1179 $P < 0,001$	6/8 (75%)	0,7934 ± 0,8607 $P < 0,05$	3 / 8 (37,5%)
Canthin-6-one (5 mg)	7	Oral	0,1105 ± 0,0387 $P < 0,001$	7 / 7 (100%)	0,3953 ± 0,7531 $P < 0,05$	3 / 7 (42,9%)
Canthine-6-one (5 mg)	8	SC	0,1426 ± 0,1447 $P < 0,05$	4 / 7 (57,1%)	1,3476 ± 0,6327 $P < 0,001$	2 / 6 (33,3%)

Sérologie: ELISA anti-*T. cruzi*.

® 40 jours post-infection; 15 jours post-traitement

10 ▽ 68 jours post-infection; 45 jours post-traitement.

Valeur de *P* versus témoins non traités

15 Comme on peut le constater sur la figure 2, la canthin-6-one administrée par voie orale, à une dose de 5 mg/kg/j montre à partir du 39^{ème} jour après l'infection parasitaire, et 15 jours après la fin du traitement, une activité bien supérieure au benznidazole employé à la dose de 50 mg/kg/j. Elle induit une éradication totale de *Trypanosoma cruzi* de l'organisme infecté, ce qui ne permet pas d'obtenir le benznidazole. Ces résultats sont confirmés en sérologie par le test ELISA à 15 et 48 jours 20 après la fin du traitement comme cela est illustré sur les figures 3 et 4.

REVENDICATIONS

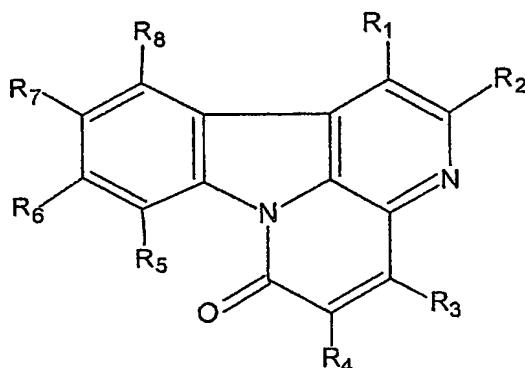
1. Utilisation de la canthin-6-one, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase.
- 5 2. Utilisation de la canthin-6-one, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase selon la revendication 1, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait de plante.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait d'une plante choisie parmi : *Ailanthus altissima*, *Brucea antidysenterica*, *Eurycoma harmandiana*, *Peganum nigellastrum*, *Zanthoxylum elephantiasis* et *Zanthoxylum chiloperone*.
- 15 4. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la canthin-6-one est présente sous forme d'un extrait de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*.
5. Utilisation de la canthin-6-one selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une trypanosomiase dans sa phase chronique et sa phase aiguë.
- 20 6. Utilisation de la canthin-6-one selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de la maladie de Chagas.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 précédentes, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement d'une trypanosomiase causée par l'agent *Trypanosoma brucei*.
- 25 8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 précédentes, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement d'une trypanosomiase causée par l'agent *Trypanosoma cruzi*.
9. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'extrait de plante contenant la canthin-6-one est obtenu par un procédé comportant une première étape qui consiste à broyer les écorces séchées du tronc de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* puis à les traiter par une solution alcaline aqueuse.
- 30 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'extrait de plante contenant la canthin-6-one est obtenue par un procédé comportant une seconde étape consistant en une extraction par un solvant organique chloré.
11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 précédentes, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une dose comprise entre 0,01 et 100 mg/kg/j de canthin-6-one, de préférence entre 0,1 et 50 mg/kg/j, encore plus préférentiellement entre 1 et 20 mg/kg/j.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré par voie orale.

13. Utilisation d'un dérivé de la canthin-6-one répondant à la formule (I) ci-dessous :

5

10



15

(I)

dans laquelle R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ représentent indépendamment l'un de l'autre :

- un atome d'hydrogène,
- un groupement alkyle en C₁-C₁₂ linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- un atome d'halogène choisi parmi le chlore, le fluor, le brome et l'iode,
- un groupement halogénoalkyle en C₁-C₁₂ dont la chaîne alkyle peut être linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée, et le ou les atomes d'halogène sont choisis parmi le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- une fonction hydroxyle,
- une fonction nitro -NO₂
- une fonction cyano -CN
- une fonction -SH
- une fonction acide carboxylique -COOH
- une fonction amide -CONH₂
- une fonction amine -NH₂
- une fonction alcoxy en C₁-C₁₂ dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
- une fonction ester d'alkyle en C₁-C₁₂, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé

- une fonction alkyl amide secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C₁-C₁₂ peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylamine secondaire ou tertiaire dans laquelle le ou les groupements alkyle en C₁-C₁₂ peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés,
- une fonction alkylthio en C₁-C₁₂, dans laquelle le groupement alkyle peut être linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé,
pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une
10 trypanosomiase.

Schéma d' extraction des écorces de *Zanthoxylum chilopervine* (Rutaceae)

Écorces de tronc (1.9 kg)

Broyage puis alcalinisation par NH₄OH

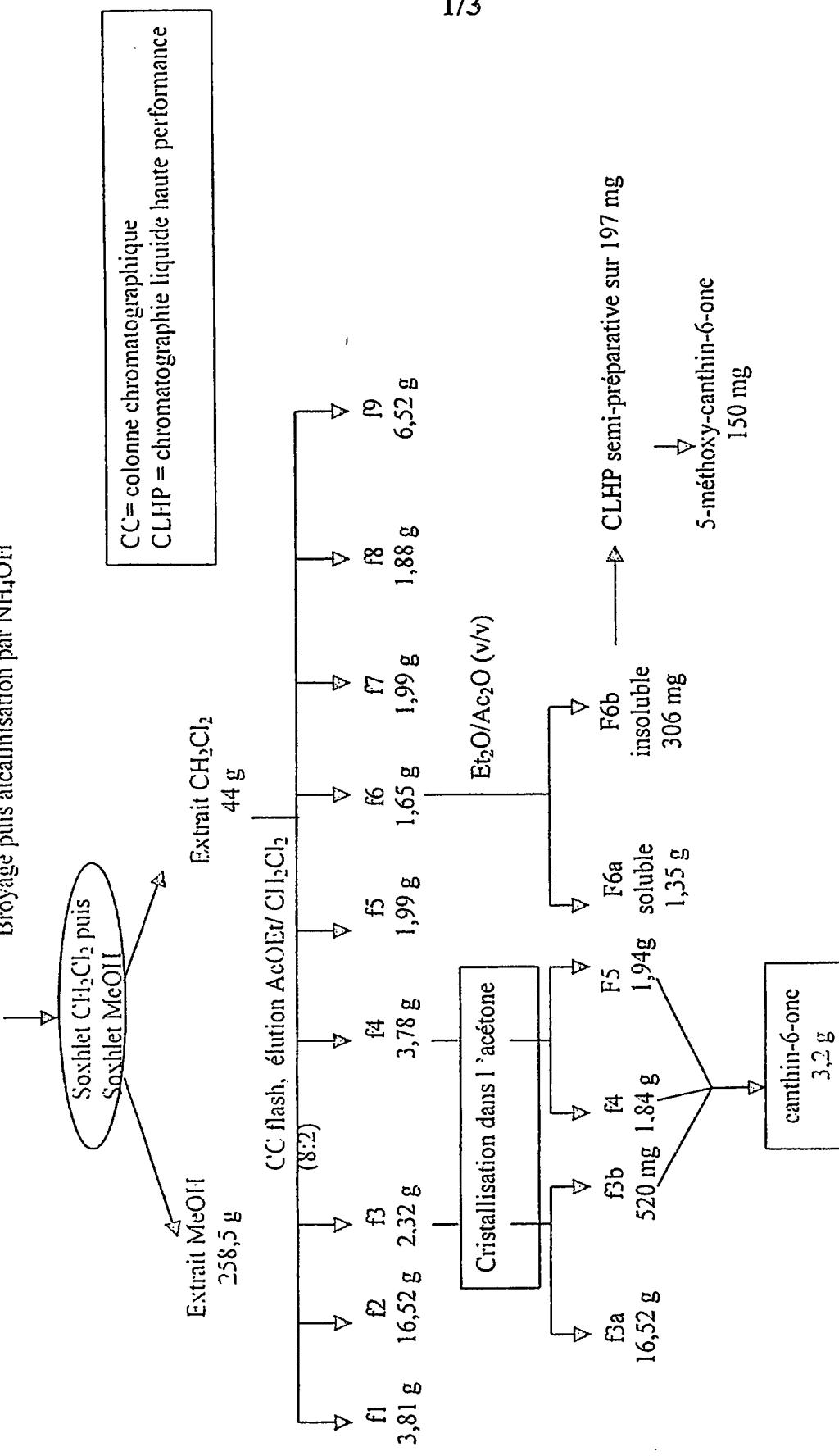


FIGURE 1

Efficacité de la canthine-6-one, du benznidazole sur des souris infectées expérimentalement avec
Trypanosoma cruzi

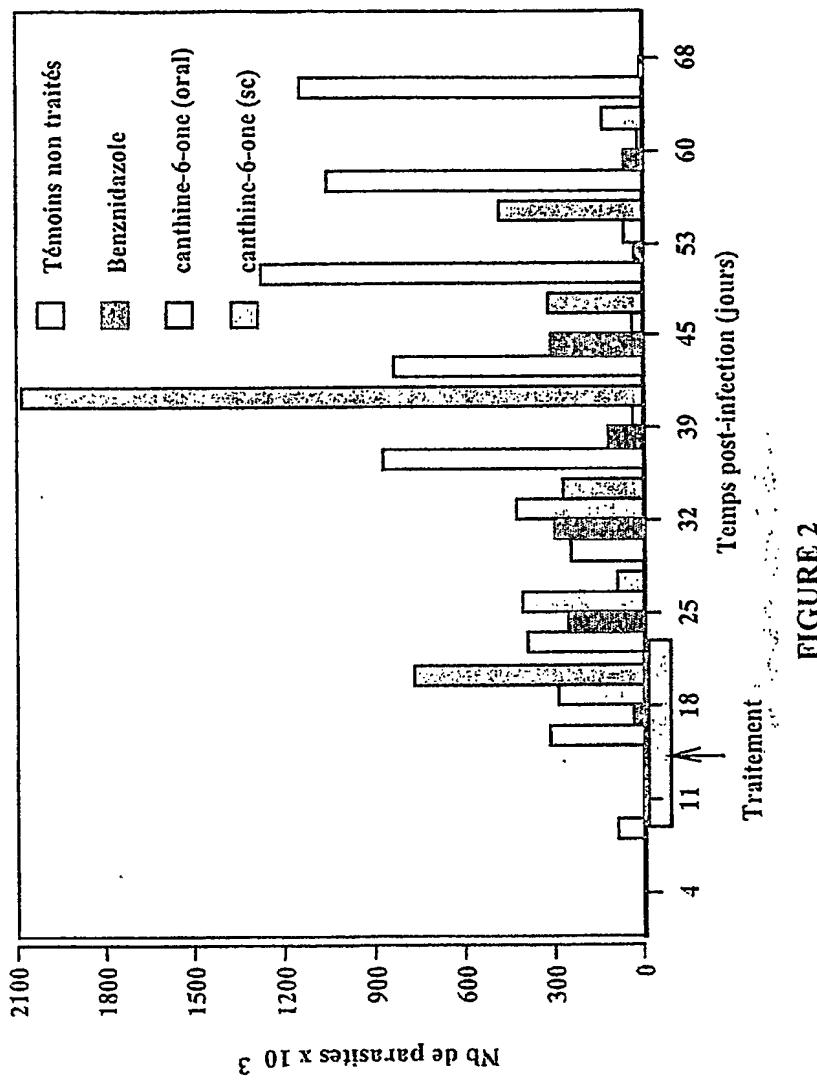


FIGURE 2

Effet du traitement avec la canthin-6-one ou du benznidazole sur des souris Pearl Bright infectées avec *T. cruzi*. Evaluation sérologique (test ELISA)

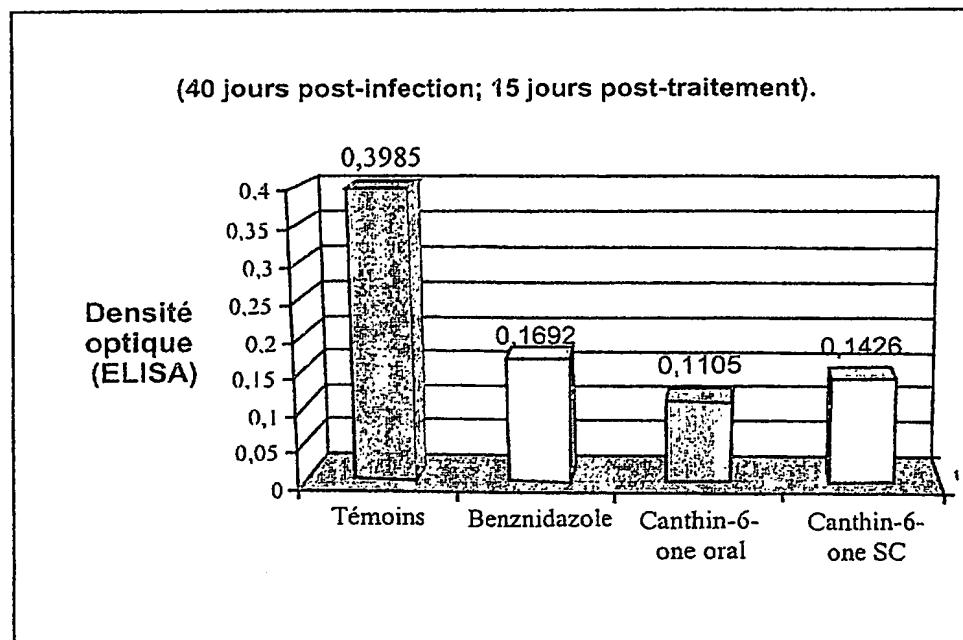


FIGURE 3

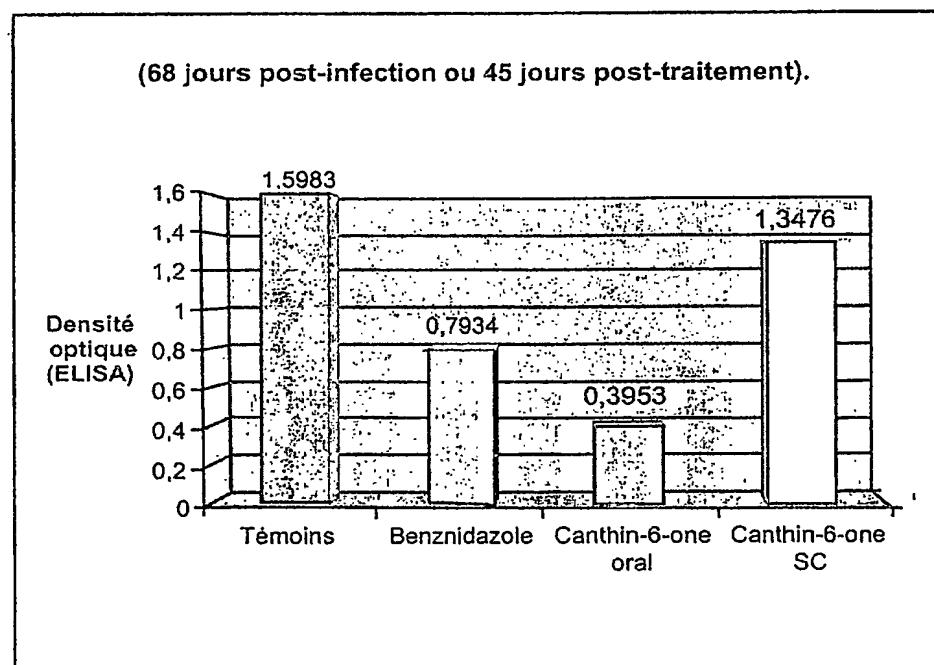


FIGURE 4

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


N° 11235°03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 2.. 

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113-17 / ZDC501

Vos références pour ce dossier (facultatif)	VCama-F785/5FR																																																							
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL																																																								
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)																																																								
UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.																																																								
LE(S) DEMANDEUR(S) :																																																								
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION																																																								
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :																																																								
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>FERREIRA</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Maria Elena</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>Juan de Mema C/ Cerro Cora</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>LUQUE (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>FOURNET</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alain</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>506, Chemin de Tastet</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>14 0 2 9 0 OSSAGES</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="3">S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> DATE ET SIGNATURE(S) Paris, le 25 novembre 2002 DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> ORES Béatrice 92-4046 </td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FERREIRA	Prénoms		Maria Elena	Adresse	Rue	Juan de Mema C/ Cerro Cora	Code postal et ville	LUQUE (PARAGUAY)	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>FOURNET</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alain</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>506, Chemin de Tastet</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>14 0 2 9 0 OSSAGES</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FOURNET	Prénoms		Alain	Adresse	Rue	506, Chemin de Tastet	Code postal et ville	14 0 2 9 0 OSSAGES	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROJAS DE ARIAS	Prénoms		Antonietta	Adresse	Rue	C/ Concordia y Florida	Code postal et ville	1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)	Société d'appartenance (facultatif)			S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			DATE ET SIGNATURE(S) Paris, le 25 novembre 2002 DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			ORES Béatrice 92-4046		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FERREIRA																																																						
Prénoms		Maria Elena																																																						
Adresse	Rue	Juan de Mema C/ Cerro Cora																																																						
	Code postal et ville	LUQUE (PARAGUAY)																																																						
Société d'appartenance (facultatif)																																																								
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>FOURNET</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Alain</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>506, Chemin de Tastet</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>14 0 2 9 0 OSSAGES</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FOURNET	Prénoms		Alain	Adresse	Rue	506, Chemin de Tastet	Code postal et ville	14 0 2 9 0 OSSAGES	Société d'appartenance (facultatif)			<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROJAS DE ARIAS	Prénoms		Antonietta	Adresse	Rue	C/ Concordia y Florida	Code postal et ville	1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)	Société d'appartenance (facultatif)																											
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FOURNET																																																						
Prénoms		Alain																																																						
Adresse	Rue	506, Chemin de Tastet																																																						
	Code postal et ville	14 0 2 9 0 OSSAGES																																																						
Société d'appartenance (facultatif)																																																								
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROJAS DE ARIAS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Antonietta</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>C/ Concordia y Florida</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROJAS DE ARIAS	Prénoms		Antonietta	Adresse	Rue	C/ Concordia y Florida	Code postal et ville	1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)	Société d'appartenance (facultatif)																																											
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROJAS DE ARIAS																																																						
Prénoms		Antonietta																																																						
Adresse	Rue	C/ Concordia y Florida																																																						
	Code postal et ville	1 1 1 6 5 ATILIO PENA (PARAGUAY)																																																						
Société d'appartenance (facultatif)																																																								
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.																																																								
DATE ET SIGNATURE(S) Paris, le 25 novembre 2002 DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)																																																								
ORES Béatrice 92-4046																																																								

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

INV

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

ca 113 w / 270501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		VCama-F785/5FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0214729
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE LA CANTHIN-6-ONE, DES EXTRAITS DE PLANTES LA CONTENANT ET DE SES DERIVES DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT UNIVERSITE NATIONALE D'ASUNCION		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		HOCQUEMILLER
Prénoms		Reynald
Adresse	Rue	9, rue d'Arpajon
	Code postal et ville	19 1 4 7 0 LIMOURS
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) Paris, le 25 novembre 2002		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice 92-4046		